



UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CONTROLE DE BOLORES DETERIORANTES EM MORANGOS FRESCOS (*Fragaria x ananassa* Duch)

P. F.P. da Costa¹, A.B. Maretoli², K.S. Horbe³

1-Docente do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui – CEP: 97650-000 – Itaqui – RS – Brasil, Telefone:(55) 3432-1850 – E-mail: paulacosta@unipampa.edu.br

2- Acadêmica do curso de Nutrição. Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui. E-mail: aribmaretoli@gmail.com.

3 –Acadêmica do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui. E-mail: kaelly_horbe@hotmail.com.

RESUMO – Objetivou-se identificar os principais bolores deteriorantes de morangos e avaliar o efeito do tempo de imersão em solução de peróxido de hidrogênio (8%) (SPH8) no controle de bolores deteriorantes. Foram isolados bolores de morangos com sinais de deterioração e posteriormente foram inoculados nos frutos para avaliação do efeito do tempo de imersão em SPH8. Os principais bolores observados foram *Colletotrichum* sp., *Trichoderma* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. A imersão dos morangos em SPH8 reduziu em 2 logs a população de *Cladosporium* sp., passando de 6,4 para 4,3 log UFC/g em 30 minutos. Para *Botrytis cinerea* a redução foi de 3 logs UFC/g nos primeiros 10 minutos de tratamento, passando de 6,0 para 3,0 logs UFC/g. A imersão de morangos em SPH8 por 10 minutos é suficiente para uma redução desejável de *B. cinerea*, no entanto, para o controle de *Cladosporium* sp. necessita de ajustes para incrementar seu o poder de ação.

ABSTRACT – The objective of this study was to identify the main spoilage mold strawberries and evaluate the effect of time of immersion in hydrogen peroxide solution (8%) (HPS8) on the control spoilage molds. Molds from deteriorated strawberries were isolated and then inoculated into the fruits to evaluate the effect of the immersion time in HPS8. The main molds observed were *Colletotrichum* sp., *Trichoderma* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. The immersion of strawberries in HPS8 reduced the population of *Cladosporium* sp. by 2 logs, from 6.4 to 4.3 log CFU/g in 30 minutes. For *Botrytis cinerea* the reduction was 3 CFU/g logs in the first 10 minutes of treatment, reducing from 6.0 to 3.0 CFU/g logs. The immersion of strawberries in SPH8 for 10 minutes was sufficient for a desirable reduction of *B. cinerea*, however, for the control of *Cladosporium* sp. it needs adjustments to increase its power of action.

PALAVRAS-CHAVE: *Botrytis cinerea*; *Cladosporium* sp; deterioração de alimentos.

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*; *Cladosporium* sp; food spoilage.

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é consumido em muitos países por apresentar características sensoriais atrativas e nutricionais bem definidas, além de conter substâncias bioativas, como bioflavonóides,



substâncias que auxiliam na redução do risco de incidência de alguns tipos de câncer (Rocha et al., 2008). No entanto, apesar de ser um fruto muito aceito, apresenta problemas de conservação, tendo a sua vida útil reduzida pela ação de micro-organismos causadores de problemas fitossanitários e também devido a sua sensibilidade ao dano mecânico e perda de água nos tecidos (Reis et al., 2008; Malgarim et al., 2006; Mirahmadi et al., 2011).

Desta forma, a vida útil de morangos mesmo quando armazenados sob refrigeração é curta, com isso, a manutenção da qualidade e sua comercialização torna-se um desafio. Silva (2004) avaliando o armazenamento sob refrigeração relatou que os pseudofrutos podem ser armazenados por até 12 dias, já para Junior et al. (2016) avaliando o armazenamento em temperatura ambiente, reportaram que os morangos se tornam impróprios para consumo a partir do sexto dia. Estas alterações são causadas principalmente pelo ataque de bolores, que encontram condições favoráveis ao seu crescimento no ambiente de cultivo e também nas características dos pseudofrutos, como o seu conteúdo de açúcares e outros nutrientes, atividade de água ideal para o crescimento fúngico e baixo pH (Vu et al., 2011).

Como os deteriorantes do morango são adaptados a baixas temperaturas, o uso da refrigeração pode inibir o crescimento bacteriano, porém não é suficiente para impedir a deterioração fúngica. Sendo necessário o uso de outras medidas adicionais, como por exemplo, a lavagem seguida da sanitização, com agentes químicos ou físicos, de forma a reduzir a população de micro-organismos deterioradores e eliminar os patogênicos.

O principal agente utilizado para este propósito é o cloro, no entanto, apesar de sua efetividade, diversos trabalhos apontam entraves e restrições devido a formação de subprodutos tóxicos, como os compostos organoclorados, trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (Silva et al., 2011) Diversas pesquisas têm buscado alternativas ao seu uso, dentre as opções estão as tecnologias que não deixam resíduos, como o peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante versátil que tem muitas aplicações práticas. Em alimentos, são várias as possíveis aplicações como agente antimicrobiano, podendo ser destacados a preservação e o controle do apodrecimento pós-colheita de inúmeras frutas e hortaliças frescas, e a preservação de produtos minimamente processados (Sapers, Miller, Mattrazzo, 1999). Dentre os oxidantes químicos disponíveis, o H_2O_2 é considerado um dos mais ecológicos, pois o subproduto de suas oxidações é a água. O que além de diminuir custos com eliminação de resíduos, respeita as regulamentações ambientais vigentes. Também é um dos oxidantes mais eficientes, em virtude do seu elevado teor de oxigênio (Voloshin, Halder, Lawal, 2007; Ntainjua et al., 2011; Samanta, 2008).

Objetivou-se com este estudo identificar os principais fungos deteriorantes de morangos frescos e avaliar o efeito do tempo de permanência em solução de peróxido de hidrogênio (8%) no controle de bolores deteriorantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

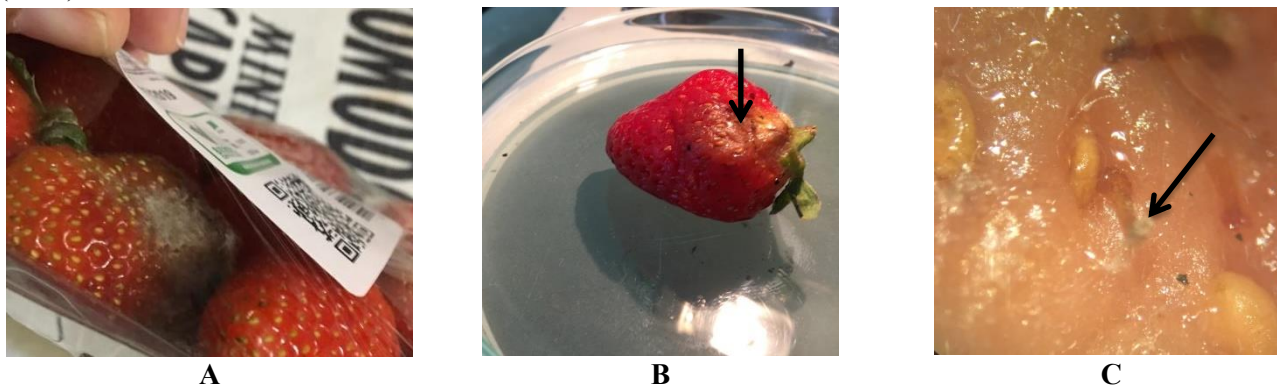
Foram utilizados morangos em ponto de maturação, adquiridos em supermercados locais. Os pseudofrutos foram selecionados de acordo com a uniformidade de cor, tamanho e ausência de injúrias mecânicas, fisiológicas e lavados em água corrente para posterior utilização nos ensaios. Os experimentos foram realizados no período de fevereiro a junho de 2019.

2.1 Identificação dos principais micro-organismos deteriorantes do morango: Isolamento dos patógenos e identificação dos fungos

Foram observados morangos *in natura*, sem pré-lavagem, que apresentavam sinais de danos fitopatológicos e, com o auxílio de uma lupa estereoscópica e alça bacteriológica, os bolores foram coletados e

transferidos para placas contendo *Ágar Potato Dextrose* (PDA) (HiMedia®) para posterior incubação em estufa durante 5 dias a 23°C (Figura 1).

Figura 1 – (A) e (B) Morangos com sinais de danos fúngicos; (C) Imagem obtida em lupa estereoscópica da lesão fitopatológica e destaque do patógeno presente no tecido (ampliação de 40 vezes). Fonte: Os autores (2019).



A identificação foi realizada após o isolamento e purificação através da observação de características morfológicas, como tamanho da colônia, cor do micélio, cor dos conídios e característica das estruturas de reprodução, utilizando a chave descrita em Pitt e Hocking (2009).

Os esporos obtidos do isolamento foram armazenados em tubos de 3 mL com água destilada estéril para posterior utilização para inoculação dos pseudofrutos e avaliação do comportamento frente ao tratamento dos pseudofrutos com imersão em solução de peróxido de hidrogênio. A definição da concentração de esporos na solução foi realizada através da contagem com o auxílio do Hemacitômetro e por inoculação em meio PDA com posterior contagem de colônias.

2.2 Avaliação do efeito do tratamento dos morangos com peróxido de hidrogênio no controle de bolores deteriorantes

Para avaliação dos micro-organismos deteriorantes foram utilizados os bolores *Botrytis cinerea* (oriundos de uvas Rubi e pertencentes à micoteca do laboratório) e *Cladosporium* sp (isolados neste estudo). Os pseudofrutos foram pré-lavados em água, separados em dois lotes, sendo um lote inoculado por imersão em uma solução de esporos de *Botrytis cinerea* ($3,2 \cdot 10^4$ esporos/mL) e outro lote inoculado com *Cladosporium* sp ($5,0 \cdot 10^4$ esporos/mL), onde permaneceram durante 1 hora, em seguida foram escorridos e secos naturalmente por 18 horas. A escolha dos fungos levou em consideração a sua importância na deterioração dos pseudofrutos.

Os morangos inoculados foram submetidos ao tratamento de imersão em solução de peróxido de hidrogênio 8% (Vetec) por diferentes tempos de imersão (0 a 60 minutos). Após o tempo de imersão de cada tratamento os pseudofrutos foram escorridos e realizada a contagem de bolores e leveduras pela técnica do espalhamento em superfície, inoculando-se 0,1 mL de diluições seriadas em *Ágar Potato Dextrose* (PDA) e incubação durante cinco dias a 25 °C (Silva et al., 2010).

2.3 Análise dos dados

O processamento dos dados foi realizado no programa Microsoft Excel 2010 e expressos a partir de análise descritiva, média de três repetições e construção de gráficos de dispersão, contendo o modelo obtido e seu coeficiente de determinação (R^2).

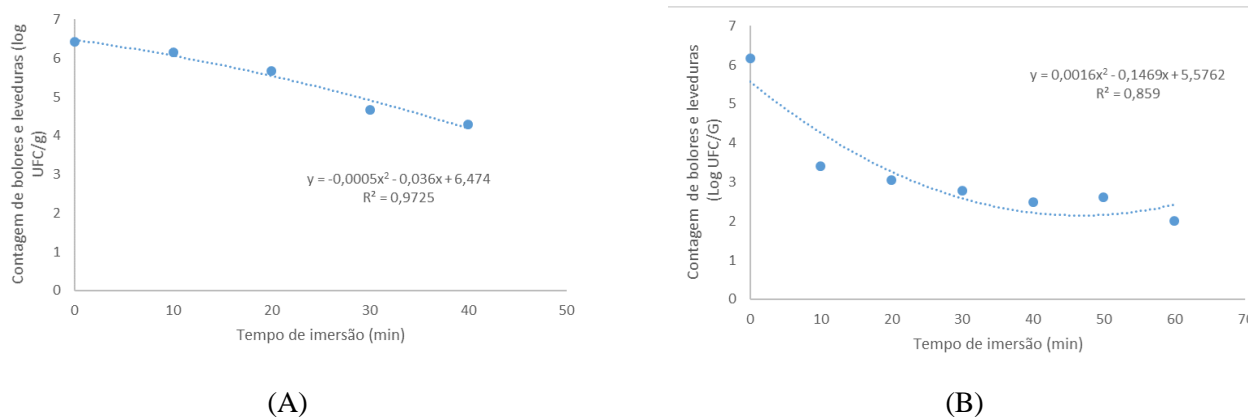
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os bolores mais frequentes observados neste estudo foram *Colletotrichum* sp., *Trichoderma* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, encontrados em todos os lotes adquiridos. Também foram encontradas diversas leveduras e, em alguns lotes observou-se a presença eventual de *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp, sendo a maioria das espécies encontradas reconhecidas como causadoras de lesões nos pseudofrutos.

Apesar de o bolor *Botrytis cinerea* ser considerado um dos principais agentes de deterioração do morango, neste estudo não houve a sua detecção. Este fato provavelmente pode estar associado às altas temperaturas dos meses em que o experimento ocorreu, visto que este fungo apresenta um ótimo crescimento na faixa de 20°C (Pitt e Hocking, 2009; Ueno, 2014). E também porque os pseudofrutos foram oriundos do cultivo hidropônico, o que evita o contato com a fonte do inóculo, por se tratar de um fungo saprofítico que vive em restos culturais (Ueno, 2014). No estudo realizado por Tournas e Katsoudas (2005), além do gênero *Botrytis*, foram isolados de morangos fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Trichoderma*.

Na Figura 2 estão apresentadas as contagens de bolores e leveduras dos morangos inoculados artificialmente com fungos deteriorantes e submetidos a imersão em solução de peróxido de hidrogênio por diferentes tempos. A sobrevivência dos micro-organismos nos morangos é variável conforme a espécie e depende dos mecanismos intrínsecos de defesa relativos a cada cepa.

Figura 2 – Efeito do tempo de imersão em solução de peróxido de hidrogênio 8% sobre a contagem de bolores e leveduras de morangos inoculados artificialmente com fungos deteriorantes, onde (A) morangos inoculados com *Cladosporium* sp e (B) morangos inoculados com *Botrytis cinerea*.



A imersão dos morangos em solução de peróxido de hidrogênio 8% reduziu em aproximadamente 2 logs a população de *Cladosporium* sp., passando de 6,4 para 4,3 log UFC/g em 30 minutos, verificando-se uma lenta redução ao longo do tempo de tratamento. Já para *Botrytis cinerea* observa-se uma redução de aproximadamente 3 logs UFC/g nos primeiros 10 minutos de imersão na solução, passando de 6,0 logs UFC/g para 3,0 logs UFC/g. No entanto, após os primeiros 10 minutos a redução ocorreu de forma lenta, remanescendo 2,0 log UFC/g ao final dos sessenta minutos de tratamento. Embora não seja exigida pelas normas nacionais vigentes, a manutenção da contagem de bolores e leveduras em na faixa de 2,0-3,0 log UFC/g é importante para retardar o processo de deterioração (Forsythe, 2013).

Este comportamento pode ser comparado aos resultados reportados por Lapeña et al. (2019), que demonstraram uma redução na população epifítica do morango para aproximadamente 2,4 logs UFC/g através



da sanitização com ácido peracético ou cloro. Isto demonstra que o agente sanitizante objeto deste estudo, possui efeito equivalente a outros sanitizantes convencionais.

Estes diferentes comportamentos quando expostos ao peróxido de hidrogênio observado entre espécies estão ligadas aos mecanismos de defesa ou a sua ausência que leva à sensibilidade ao peróxido e suas formas tóxicas, os radicais ROS (espécies reativas de oxigênio). Alguns fungos, como certas leveduras, são capazes de induzir a formação de peróxido nas plantas e são resistentes à sua ação como, por exemplo, as leveduras *Metschnikowia fructicola* e *Candida oleophila*, que são utilizadas como agentes de biocontrole de patógenos vegetais, pois estimulam a defesa e apesar da presença das formas tóxicas do oxigênio, são capazes de crescer devido à síntese de enzimas que neutralizam a ação intracelular dos ROS (Macarisin et al., 2010).

Por outro lado, alguns fungos são sensíveis à ação do ROS, isto está ligado à ação do peróxido em suas células. A morte das células fúngicas e perda da viabilidade de esporos está relacionado à inibição da respiração e perda do potencial da membrana mitocondrial, como demonstrado por Qin et al. (2011) avaliando a ação do peróxido de hidrogênio sobre proteínas mitocondriais e seu papel na morte do bolor *Penicillium expansum* e da levedura *Candida albicans*. Os autores reportaram que a exposição do patógeno ao peróxido de hidrogênio causou uma perda da viabilidade das mitocôndrias havendo o aumento no nível de oxidação e consequentemente induzindo a morte dos fungos (Qin et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

Apesar de *Botrytis cinerea* ser reconhecido como um dos principais agentes de deterioração do morango, não houve a sua detecção neste estudo, sendo observado que os principais agentes responsáveis pela deterioração de morangos disponíveis na época do desenvolvimento desta pesquisa foram o *Colletotrichum* sp., fungo causador de lesões que ocorrem nas fases de formação dos pseudofrutos tornando-os escuros e mumificados e *Cladosporium* sp, causador de lesões pós-colheita escuras com presença de material pulverulento.

A imersão de morangos em solução de peróxido de hidrogênio 8% por 10 minutos é suficiente para uma redução desejável de *Botrytis cinerea*. No entanto, para o controle de *Cladosporium* sp. ainda necessita de ajustes para incrementar seu o poder de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade Júnior, VC; Guimarães, AG; Azevedo, AM; Pinto, NAVD; Ferreira, MAM. (2016). Conservação pós-colheita de frutos de morangueiro em diferentes condições de armazenamento. *Horticultura Brasileira* 34(3): 405-411. Disponível em <https://doi.org/10.1590/hb.v34i3.633>

da Silva, N., Junqueira, V. C. A., de Arruda Silveira, N. F., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S, Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. Editora Varela.

da Silva, S. B., de Mello Luvielmo, M., Geyer, M. C., & Prá, I. (2011). Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(2), 659-682. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4457/445744101026>

Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Artmed Editora.

Macarisin, D., Droby, S., Bauchan, G., & Wisniewski, M. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol?. *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 194-202. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.07.008>

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Malgarim, Marcelo Barbosa, Cantillano, Rufino Fernando Flores, & Coutinho, Enilton Fick. (2006). Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2), 185-189. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000200007>
- Mirahmadi, F., Hanafi, Q. M., & Mohammadi, H. (2012). Effect of low temperatures on physico-chemical properties of different strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 7(7).
- Nicolau-Lapeña, I., Abadias, M., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I., Lafarga, T., & Viñas, I. (2019). Strawberry sanitization by peracetic acid washing and its effect on fruit quality. *Food microbiology*, 83, 159-166. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.004>
- Ntainjua, E. N., Piccinini, M., Pritchard, J. C., Edwards, J. K., Carley, A. F., Kiely, C. J., & Hutchings, G. J. (2011). Direct synthesis of hydrogen peroxide using ceria-supported gold and palladium catalysts. *Catalysis today*, 178(1), 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2011.06.024>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. New York: Springer.
- Qin, G., Liu, J., Cao, B., Li, B., & Tian, S. (2011). Hydrogen peroxide acts on sensitive mitochondrial proteins to induce death of a fungal pathogen revealed by proteomic analysis. *PLoS One*, 6(7), e21945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021945>
- Reis, Kelen Cristina dos, Siqueira, Heloisa Helena de, Alves, Alessandra de Paiva, Silva, José Daniel, & Lima, Luiz Carlos de Oliveira. (2008). Efeito de diferentes sanitizantes sobre a qualidade de morango cv. Oso Grande. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(1), 196-202. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000100029>
- Rocha, Denise Alvarenga, Abreu, Celeste Maria Patto de, Corrêa, Angelita Duarte, Santos, Custódio Donizete dos, & Fonseca, Ellem Waleska Nascimento da. (2008). Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(4), 1124-1128. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000400046>
- Samanta, C. (2008). Direct synthesis of hydrogen peroxide from hydrogen and oxygen: An overview of recent <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2008.07.043>
- Sapers, G. M., Miller, R. L., & Mattrazzo, A. M. (1999). Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in golden delicious apples. *Journal of Food Science*, 64(4), 734-737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15121.x>
- Silva, C. S. (2004). *Qualidade e conservação do morango tratado em pós-colheita com cloreto de cálcio e do armazenamento em atmosfera modificada ativa* (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo.
- Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International journal of food microbiology*, 105(1), 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002>
- UENO, B. (2014). Mulching protege o solo e o morango. *Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Voloshin, Y., Halder, R., & Lawal, A. (2007). Kinetics of hydrogen peroxide synthesis by direct combination of H₂ and O₂ in a microreactor. *Catalysis Today*, 125(1-2), 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.01.043>
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.037>

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br